腎尿細管細胞 (LLC-PK₁) における蓚酸の能動的取り込み

国立南和歌山病院泌尿器科, *和歌山県立医科大学泌尿器科, **Department of Physiology and
***Division of Urology and Transplantation surgery, University of Massachusetts Medical
School, Worcester, MA, USA

戎野 庄一 大川 順正* Cheryl Scheid**
Mani Menon***

ACTIVE UPTAKE OF OXALATE IN A RENAL TUBULAR CELL LINE (LLC-PK₁)

Shoichi Ebisuno, Tadashi Ohkawa*, Cheryl Scheid** and Mani Menon***

Department of Urology, Minami Wakayama National Hospital and *Wakayama Medical College

Department of Physiology and *Division of Urology and Transplantation Surgery,
University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA

The oxalate uptake was studied in LLC-PK₁ cells, an epithelial cell line originated in proximal tubular cells of porcine kidney. It was clear that the cells contain an oxalate exchanger highly sensitive to 4,4-diisothio-cyanostilbene-2'-disulfonic acid (DIDS). The uptake was inhibited by the addition of inorganic anions (chloride, sulphate and bicarbonate) to the reaction system, but was unaffected by sodium ion. The data suggest the possibility that it should be consistent with at least two transport systems for oxalate in LLC-PK₁ cells, a SO₄²⁻/oxalate/HCO₃⁻ exchanger and a Cl⁻/oxalate exchanger.

Key words: oxalate, LLC-PK₁ cell, anion transporter

要旨: 豚の近位尿細管由来の LLC-PK₁ 細胞において [¹⁴C] にラベルされた蓚酸を用いて, 細胞内への蓚酸の取り込みを検討した。

その結果, LLC-PK₁ 細胞の管腔側膜から細胞内への方向には DIDS で阻害される能動的と考えられる取り込みが存在すること, 他の陰イオン (塩素, 重炭酸および硫酸) により阻害を受けること, およびこの輸送系はナトリウムイオン濃度には影響を受けないことなどを明らかにした。このような実験結果から, LLC-PK₁ 細胞には SO₄²⁻/oxalate/HCO₃⁻ および Cl⁻/oxalate の 2 つの輸送系が存在している可能性が示唆された。

キーワード: 蓚酸, LLC-PK₁ 細胞, 陰イオン輸送

結 言

蓚酸は尿路結石の構成成分として極めて重要な物質である。腎における蓚酸の輸送形態の概略については先人達の微細な free flow micropuncture や clearance study により, ラットでは糸球体をほぼ自由に濾過され, 近位尿細管で分泌あるいは再吸収されることが示されて来ている (1-4)。また, 細胞単位では, 近年, 腎皮質尿細管の細胞膜成分での蓚酸の輸送形態が受動拡散と能動輸送系で構成されているであろうとする報告がみられて来ている (5-7)。しかしながら, 微細な蓚酸輸送に関しては, いままでは細胞膜成分での検討にすぎず腎尿細管の細胞単位での検討はなされていなかった。

著者らは豚の近位尿細管細胞である LLC-PK₁ 細胞を用いて, 蓚酸の微細輸送系, とくに刷子縁 (brush border) 側から細胞内への能動輸送について検討すると共に, 塩素, 硫酸, 重炭酸イオンおよびナトリウムイオンの影響などを詳細に検討した。

材料と方法

細胞培養: LLC-PK₁ 細胞は American Type Culture Collection (CRL 1392) の 195 代目を入手し, 実際の輸送系の実験には継代 206 代目から 225 代目が使われた。細胞の継代は 10% 牛胎児血清 (Hyclone, Lab. Inc. Logan, Utah, USA) を混じた Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, New York, USA)

にペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) および D-グルコース (4,500mg/l) を加えたものを細胞培養液として用い, 炭酸ガス培養器 (5% CO₂, 95%air, 37°C) で通常の方法で行った。また, 蓚酸の細胞内への取り込みの定量実験には, 6 穴の培養用プレート (25mm/well, Nunc) に 5×10^4 cell/ml の細胞数に調整したものを, 各 well に 2ml ずつ分注し, 3日目に confluence に到達したものを供した。

細胞内取り込み実験; 3日目に confluence に達した細胞は, overgrowth や培養液内の種々の薬物の影響などを取り除くために, 取り込み実験開始日の 3 時間前に完全培養液を牛胎児血清の添加していない pH 7.4 の DMEM 培養液に替えることによって条件の一定化を図った。細胞は Hank's balanced salt solution (HBSS) で洗浄された後, 常に 2 つの実験群に分けた。すなわち, 一群は DMSO (dimethyl sulfoxide) で溶解した 1mM 濃度の細胞膜における陰イオン輸送阻害剤である 4,4'-diisothio-cyanostilbene-2-2'-disulfonic acid (DIDS) を HBSS に加えて, 各 well, 2ml ずつ投与し 30 分の前処理をしたものであり, この群で得られた蓚酸の細胞内取り込みは受動的拡散のみであろうと考えた。

他の群は DIDS を添加せず, 同濃度の DMSO のみを加えた HBSS で同様の前処理を行うもので, この群は受動的拡散と同時に能動的取り込みの両者をとらえたものと考えた。

その後, [¹⁴C] にラベルされた蓚酸 (最終濃度 100 μ M, New England Nuclear, Boston, Massachusetts,

USA) を加え, それぞれ 1mM の DIDS (+) および DIDS(-) の HBSS を基本の反応液とし, 種々の反応時間および種々の反応液を作成し, 細胞内への取り込みを室温で検討した。基本の反応液 (HBSS) の組成は, 以下のようである; NaCl (138mM), KCl (5.8mM), Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (0.78mM), CaCl₂ (0.25mM), MgCl₂ (0.25mM), HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 10mM), pH 7.4。硫酸イオンの影響を検討する際には KCl を K₂SO₄ に替え, 塩素イオンの影響の検討では KCl, MgCl₂ および NaCl を各々 gluconate K, MgSO₄ および gluconate Na に替えて蓚酸の細胞内取り込み実験を行った。また, 重炭酸イオンの検討には NaCl を NaHCO₃ に替え, ナトリウムイオンの影響をみる際には NaCl を choline chloride に置き換え検討した。

種々に設定された条件での反応を行った後, その反応液を除去し, その後, 蓚酸ナトリウム (100 μ M) を混じた冷い生理食塩水 (10ml) で 2 回洗浄した。さらに細胞を 10% トリクロロ酢酸 (2ml) で処理した後, scraper を用いすべての細胞を剝離し, シンチレーションバイアルに移して, radioactivity を測定した。毎回の実験に使用された生細胞数は trypan blue dye exclusion 法を用いた hemocytometer で算定し, 細胞内への蓚酸の取り込みを p moles/10⁶ cell で表わした。

なお, 実験方法の概略は Fig. 1 に示した。

また, HBSS という基本の反応液を使用した場合の細胞の蓚酸の取り込みについての時間および濃度依存

図 1 実験方法概略

性の検討に関しては、 $[^{14}\text{C}]$ にラベルされた蓚酸に加え、 $[\text{methyl-}^3\text{H}]$ inulin を用いて細胞間隙やその他への蓚酸の非特異的な取り込みを各濃度および各時間について各3回検討した結果、平均17%の細胞膜内以外の部位に蓚酸が trapping されていることがわかり、上記の時間および濃度に関する結果は得られたデータに0.83を乗じたものとした。しかし、種々の個別の条件での double isotope method による、個々の蓚酸の trapping 率は検討されなかった。

統計的な有意差検定はコンピューター解析 (Statview, Brainpower Inc, Calabasas, California) でおこない、ANOVA (multiple comparisons with a single control) および Scheffe's test (all possible comparisons) を利用し分析され、 $p < 0.05$ で有意なものと判定した。

結 果

陰イオン能動的輸送の抑制物質である DIDS の細胞内蓚酸取り込みに対する効果；図2に示したように DIDS で30分間前処理すると0.5mM から有意に細胞内への蓚酸の取り込みが抑制されたが、1mM 以上の濃度での抑制効果の増強はみられなかった。この結果から、その後の DIDS を用いての前処理は1mM とした。

細胞内への蓚酸取り込みの時間依存性；DIDS で処理しなかったものにおける細胞内への取り込み (total uptake) を受動的拡散および能動的取り込みの両者と考え、DIDS で前処理したものにおける取り込み (DIDS insensitive uptake) を受動的拡散のみと考えると、その取り込みの差 (DIDS sensitive uptake) が能動的取り込みを現わすものであらうと考えられた。

図2 DIDS による蓚酸の細胞内取り込み抑制率。データは mean $\pm$ SE (n=6) で示し、DIDS の無添加に比較した時、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ と統計的有意差が示された。

LLC-PK₁ 細胞を使った本実験系での蓚酸の能動的と考えられる取り込みは、Fig. 3 に示したように2時間までは時間依存性が認められるが、その後は平衡状態であった。

濃度依存性；蓚酸濃度を50 μM から1mM まで変化させて細胞内への蓚酸の取り込みを測定したが、DIDS sensitive uptake は200 μM でほぼ平衡に達し (Fig. 4a), Hanes-Woolf plot から本実験系での蓚酸の細胞内への DIDS sensitive uptake の K_m は45 μM と計算

図3 細胞内への蓚酸取り込みの時間依存性。本文中に示したように DIDS sensitive uptake は Total uptake より DIDS insensitive uptake を差し引いたものとした。なお、データは mean $\pm$ SE (n=9) で示した。

図4 a: 細胞内への蓚酸の濃度依存性取り込み。データは mean $\pm$ SE (n=6) で示した。b: Hanes-Woolf plot ($[S/v]$ vs $[S]$) における DIDS sensitive uptake の K_m は45 μM であった。

図5 細胞内への蓚酸取り込みに対する硫酸イオンの影響。データはmean±SE (n=6) で示した (**p<0.01)。

図6 細胞内への蓚酸取り込みに対する重炭酸イオンの影響。細胞内取り込みは10分間の反応のものであり、データはmean±SE (n=6) で示した (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)。

できた (Fig. 4b)。

硫酸イオンの影響；Fig. 5に示したように細胞外液の硫酸イオンを変化させると、DIDS 無処理群での取り込み (total uptake) は有意に下がるが、DIDS 前処理群は変化せず、両者の差、すなわち、DIDS sensitive uptake は硫酸イオンが存在すると有意に減少した。この結果から、蓚酸と硫酸は DIDS に影響を受ける陰イオンの輸送システムを共有しあっている可能性が示唆された。

重炭酸イオンの影響；25mM および50mM の塩化ナトリウムを重炭酸ナトリウムに置換して検討したが、反応液の重炭酸イオン濃度が安定なのは10分間以内との初期実験結果を得ているため、図6の結果は他と違って10分間での細胞内への取り込みを示したものである。重炭酸イオンを添加すると蓚酸の DIDS sensitive uptake が明らかに減少し、蓚酸と重炭酸イオンは共通の輸送システムをもつ可能性が考えられた。

塩素イオンの影響；反応液中の KCl および MgCl₂

図7 細胞内への蓚酸取り込みに対する塩素イオンの影響。データはmean±SE (n=6) で示した (**p<0.01, ***p<0.001)。

図8 細胞内への蓚酸取り込みに対するナトリウムイオンの影響。データはmean±SE (n=6) で示した。

を各々 gluconate K および MgSO₄ に置換し、NaCl に対応する量を gluconate Na に替えて蓚酸の細胞内取り込みを検討したが、塩素イオンが減少するにつれ蓚酸の DIDS sensitive uptake が徐々に増加し、塩素イオンの欠落状態では極めて著明な取り込みを示した (図7)。この結果から、LLC-PK₁細胞においては蓚酸と塩素は競合し、共通の輸送系を有している可能性が示唆された。

ナトリウムイオンの影響；NaCl の対応量を choline chloride に置換してナトリウムイオンの影響をみた。図8に示したごとくナトリウムイオンには蓚酸の total uptake および DIDS insensitive uptake に全く有意の影響を与えず、本実験系では DIDS sensitive uptake は陽イオンであるナトリウムには影響を受けなかった。

考 察

現在までラットにおける free flow micropuncture や clearance study において蓚酸は糸球体をほぼ自由に濾過され (1)、近位尿細管で分泌あるいは再吸収されることが示されて来ている (1-4)。これに関連す

図9 いままでに明らかにされているラット腎での蓚酸の分泌および再吸収の模式図。

図10 腎尿細管細胞膜での $\text{Cl}^-/\text{oxalate}$ イオンの相互交換の模式図 (Aronson (8) の総説から引用)。

る文献を引用して記載すると、ラットの腎での蓚酸の分泌・再吸収は図9に示す通りである。

LLC-PK₁細胞の塩素イオンと蓚酸の取り込みの競合阻害は明らかであり、細胞膜上での蓚酸イオンと塩素イオンとの交換の模式図を、今回の結果と Aronson (8) および Yamakawa & Kawamura (6) の論文を参照にすると図10に示したようなものが想定できる。

また、蓚酸が重炭酸および硫酸イオンと同一の陰イオン交換系をもっていることは家兎(7, 8)、ラット(9, 10)あるいは仔牛(11)の尿細管の膜成分を用い、既に個別にさまざまな方法でその確認がなされている。

他方、ナトリウムイオンと蓚酸輸送の関連性については、ナトリウム依存性があるとする報告(6, 7)、

および著者らの結果と同様に全く影響のない輸送系である(8)とする説の両者があり、この点も今後の検討が待たれるところであるが、著者らの実験では蓚酸が直接的に関与する陰イオンの輸送系はナトリウムとの関連性がないと思われる結果が得られた。

今回の実験に使用された LLC-PK₁細胞は、近位尿細管として多くの性質をもっており、既に各種イオンやアミノ酸を初めとする種々の物質の輸送系の研究(12-16)などに用いられており、陰イオンの1つである蓚酸の尿細管レベルでの輸送形態の研究には適するものと思われる。しかしながら、放射線性物質にラベルされた物質を用いての輸送形態の実験には、非特異的に trapping される部分が存在するという事実、さらに常に細胞の viability を一定にするにはかなりの困難があることなどの多くの問題点があることも事実である。

蓚酸の腎でのハンドリングの検討は、従来より腎皮質から分離された膜成分を用いて行われて来ているところであるが、本研究のように monolayer に発育し尿細管を想定できる LLC-PK₁細胞を用いることにより、管腔側膜 (brush border membrane) あるいは間質側膜 (basolateral membrane) からの能動的な蓚酸転送・輸送の検討が可能になり、さらに、腎結石などの尿細管での蓚酸輸送系の異常に関連しているであろう疾患では、その核心に迫る可能性をうかがえるものと思われる。

結 語

豚の近位尿細管由来の LLC-PK₁ 細胞において [¹⁴C] にラベルされた蔞酸を用いて、細胞内への蔞酸の取り込みを検討した。その結果、LLC-PK₁ 細胞の管腔側膜から細胞内の方向には DIDS で阻害される能動的と考えられる取り込みが存在すること、他の陰イオン（塩素、重炭酸および硫酸）により阻害を受けること、およびこの輸送系はナトリウムイオン濃度には影響を受けないことなどを明らかにした。このような実験結果から、LLC-PK₁ 細胞には SO₄²⁻/oxalate/HCO₃⁻ および Cl⁻/oxalate の 2 つの輸送系が存在している可能性が示唆された。

文 献

- Weinman, E.J., Frankfult, S.J., Ince, A. and Sansom, S.C.: Renal tubular transport of organic acids. Studies with oxalate and para-aminohippurate in the rat. *J. Clin. Invest.*, **61**, 801—806, 1978.
- Greger, R., Lang, F., Oberleithner, H. and Deetjen, P.: Handling of oxalate by the rat kidney. *Pflügers Arch.*, **374**, 243—248, 1978.
- Knight, T.F., Sansom, S.C., Senekjian, O.H. and Weinman, E.J.: Oxalate secretion in the rat proximal tubule. *Amer. J. Physiol.*, **240**, F295—F298, 1981.
- Senekjian, O.H. and Weinman, E.J.: Oxalate transport by proximal tubule of the rabbit kidney. *Amer. J. Physiol.*, **243**, F271—F275, 1982.
- Karniski, L.P. and Aronson, P.S.: Anion exchange pathways for Cl⁻-transport in rabbit renal microvillus membranes. *Am. J. Physiol.*, **253**, F513—F521, 1987.
- Yamakawa, K. and Kawamura, J.: Oxalate: OH exchange across rat renal cortical brush border. *Kidney Int.*, **37**, 1105—1112, 1990.
- Kuo, S.M. and Aronson, P.S.: Oxalate transport via the sulfate/HCO₃ exchanger in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9710—9717, 1988.
- Aronson, P.S.: The renal proximal tubule: A model for diversity of anion exchangers and stilbene-sensitive anion transporters. *Ann. Rev. Physiol.*, **51**, 419—441, 1989.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G. and Kloss, S.: Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. III. Specificity: Disulfonates, di- and tricarboxylates and sulfocarboxylates. *Pflügers Arch.*, **404**, 300—306, 1985.
- Bastlein, C. and Burckhardt, G.: Sensitivity of rat renal luminal and contraluminal sulphate transport systems to DIDS. *Am. J. Physiol.*, **250**, F226—F234, 1986.
- Talor, Z., Gold, R.M., Yang, W.C. and Arruda, J.A.L.: Anion exchanger is present in both luminal and basolateral renal membranes. *Eur. J. Biochem.*, **164**, 695—702, 1987.
- Hull, R.M., Cherry, W.R. and Weaver, G.W.: The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK₁. *In Vitro*, **12**, 670—677, 1976.
- Rabito, C.A. and Ausiello, A.: Na⁺-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney. *J. Membr. Biol.*, **54**, 31—38, 1980.
- Cantiello, H.F. and Rabito, C.A.: Effects of amiloride and Ca²⁺ on Na⁺22 transport by LLC-PK₁ monolayers. *Kidney Int.*, **25**, 296, 1984.
- Rabito, C.A.: Phosphate uptake by a kidney cell line (LLC-PK₁). *Am. J. Physiol.*, **245**, F22—F31, 1983.
- Caverzasio, J., Brown, C.D.A., Biber, J., Bonjour, J.P. and Hurrer, H.: Adaptation of phosphate transport in phosphate-deprived LLC-PK₁ cells. *Am. J. Physiol.*, **248**, F122—F127, 1985.

(1993年1月11日受理)